

09/926199

DOCKET NO.: 213966US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: YAMAMOTO Mitsuaki et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/01663
INTERNATIONAL FILING DATE: March 17, 2000
FOR: METHOD FOR QUANTITATING CHOLESTEROL

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	11-80503	24 March 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/01663. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP 00/01663

17.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/01663

REC'D 05 MAY 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 3月24日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第080503号

出 願 人

Applicant (s):

第一化学薬品株式会社

4

BEST AVAILABLE COPY

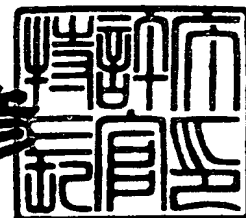
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3027930

【書類名】 特許願

【整理番号】 9910017

【提出日】 平成11年 3月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 コレステロールの定量法

【請求項の数】 29

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会
社 診断薬研究所内

【氏名】 山本 光章

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会
社 診断薬研究所内

【氏名】 高橋 洋子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会
社 診断薬研究所内

【氏名】 谷口 由利子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会
社 診断薬研究所内

【氏名】 小田原 祥子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会
社 診断薬研究所内

【氏名】 中西 一夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3-3-1 第一化学薬品株式会
社 診断薬研究所内

【氏名】 中村 光浩

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県竜ヶ崎市向陽台 3 - 3 - 1 第一化学薬品株式会社
社 診断薬研究所内

【氏名】 日野 浩一

【特許出願人】

【識別番号】 390037327

【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【代理人】

【識別番号】 100086324

【弁理士】

【氏名又は名称】 小野 信夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007375

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9711409

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コレステロールの定量法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白成分中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

【請求項 2】 試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、当該リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分に親和性を有するものである請求項第 1 項記載のコレステロール測定法。

【請求項 3】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がコレステロールである請求項第 2 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 4】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がリン脂質である請求項第 2 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 5】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がアポ蛋白質である請求項第 2 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 6】 試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物がサポニンである請求項第 1 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 7】 サポニンがステロイド系サポニンである請求項第 6 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 8】 サポニンがジギトニンまたはトマチンである請求項第 6 項または第 7 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 9】 試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、ポリエーテル系物質である請求項第 1 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 10】 ポリエーテル系物質がポリエーテル系抗生物質である請求項第 9 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 11】 ポリエーテル系物質がポリエーテル系物質が、ナイスタチン、フィリピン、ピマシリン、ペンタマイシン、トリコマイシン、フンジクロミン、ペリ

マイシン、アンホテリシン、エトルスコマイシン、プリマイシンおよびカンジジンよりなる群から選ばれたものである請求項第9項または第10項記載のコレステロールの定量法。

【請求項12】 試料中の非測定リボ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物がペプチド類である請求項第1項記載のコレステロールの定量法。

【請求項13】 ペプチド類がバシトラシン、ポリミキシン、スズカシリンまたはグラミシジンである請求項第12項記載のコレステロールの定量法。

【請求項14】 試料中の非測定リボ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物がレクチン類である請求項第1項記載のコレステロールの定量法。

【請求項15】 レクチン類がコンカナバリンA、ヒマレクチンまたはピーナッツレクチンである請求項第14項記載のコレステロールの定量法。

【請求項16】 試料中の非測定リボ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、ステロイド結合性化合物である請求項第1項記載のコレステロールの定量法。

【請求項17】 試料中の非測定リボ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リボ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロール定量用試薬。

【請求項18】 試料中の測定リボ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リボ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リボ蛋白画分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リボ蛋白画分のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

【請求項19】 試料中の測定リボ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、当該リボ蛋白成分のリボ蛋白表層を構成する成分に親和性を有するものである請求項第18項記載のコレステロール測定法。

【請求項20】 リボ蛋白成分のリボ蛋白表層を構成する成分がコレステロールである請求項第19項記載のコレステロールの定量法。

【請求項21】 リボ蛋白成分のリボ蛋白表層を構成する成分がリン脂質で

ある請求項第 1 9 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 2 2】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がアポ蛋白質である請求項第 1 9 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 2 3】 試料中の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬。

【請求項 2 4】 試料中の第 1 の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第 1 のリポ蛋白成分に比べ試料中の第 2 の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の第 2 の測定画分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する第 1 の測定画分中のコレステロールを測定し、更にこれと総コレステロール濃度から、各画分のコレステロール濃度を求める方法。

【請求項 2 5】 試料中の第 1 の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、当該リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分に親和性を有するものである請求項第 2 4 項記載のコレステロール測定法。

【請求項 2 6】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がコレステロールである請求項第 2 5 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 2 7】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がリン脂質である請求項第 2 5 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 2 8】 リポ蛋白成分のリポ蛋白表層を構成する成分がアポ蛋白質である請求項第 5 項記載のコレステロールの定量法。

【請求項 2 9】 試料中の第 1 の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第 1 のリポ蛋白成分に比べ試料中の第 2 の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、少ない試料で簡便な操作により効率良く特定画分に存在するコレステロールを分離定量することのできるコレステロールの定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】

コレステロール等の脂質は、血清中においてアポタンパクと結合し、リポタンパク質を形成している。リポタンパク質は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポタンパク（VLDL）、低比重リポタンパク（LDL）、高比重リポタンパク（HDL）等に分類される。これらのリポタンパク質のうち、LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであり、一方HDLは抗動脈硬化作用を示す事が知られている。

【0003】

疫学的には、LDL中のコレステロール値は、動脈硬化性疾患の発症頻度と正相関を示し、一方、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻度と逆相関を示す事が知られており、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的としてHDL中のコレステロールやLDL中のコレステロールの測定が広く行われている。このHDLやLDL中のコレステロールの測定法としては、たとえば超遠心分離によってHDLやLDLを他のリポタンパクと分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法が知られている。

【0004】

しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にはほとんど用いられていない方法である。

【0005】

HDL中のコレステロールの測定方法として、臨床検査の領域で一般に広く用いられている方法は、検体に沈澱剤を加えてHDL以外のリポタンパクを凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈澱法である。この方法は、沈澱法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈澱剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量

の検体量を要し、又、分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化する事はできなかった。

【0006】

一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されている。たとえば、胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法（特開昭63-126498号）が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応はLDL濃度に比例し、その後HDL中のコレステロール濃度に比例する事を利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポタンパク質中のコレステロールの反応を完全に分別する事はできず、正確性に問題があった。

【0007】

また、HDL以外のリポタンパク質をあらかじめ凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法（特開平6-242110号）が知られている。しかしながら、この方法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。また、沈澱の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析器機に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

【0008】

更に、特許第2600065号では、通常の沈澱法に用いられる、HDL以外のリポタンパクを沈澱させる沈澱試薬と一般的なコレステロール測定試薬を組み合わせ使用し、沈澱しないHDL中のコレステロールを測定する方法が開示されており、修飾酵素と α -硫酸化シクロデキストリンの組み合わせで実施できるものとされている。

【0009】

更にまた、沈澱剤の影響を軽減するために界面活性剤を共存させるもの（特開平8-116996号）やHDL以外を沈澱させるものとして従来沈澱法に用いられていた試薬以外でも、抗体を使用するもの（特開平9-96637号）、カラギナンを使用するもの（特開平9-121895号）、糖化合物を使用するも

の（特開平7-301636号）などがあるが、正常な血清を混合した際でも凝集による濁りの生成があったり、目的とするHDL以外のリポ蛋白を凝集させることを条件としているなどの問題があった。

また、LDL中のコレステロール測定法として、臨床検査の領域で一般に広く用いられる方法としては、フリードワルドら（クリニカル ケミストリー、1972年 18巻、459-502頁）の方法が知られている。この方法は、酵素的方法により求めた総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪の値を用いて、LDLコレステロールを算出する方法であるが、中性脂肪400mg/dlを超える場合には適用できないなどの問題がある。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率よく測定する事ができ、種種の自動分析装置に適用できる特定画分中のコレステロールの定量法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

かかる実状において、本発明者等は鋭意研究を行った結果、試料中の一方のリポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物と、試料中の他方のリポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤の存在下でコレステロール測定用酵素試薬との反応を行えば、試料中の特定の画分に存在するコレステロールとその他の画分に含まれるコレステロールの反応に顕著な差を設けることができ、実質的に十分な感度で目的とするリポ蛋白成分中のコレステロールを分離測定できることを見出した。

【0012】

すなわち本発明は、試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白画分中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法である。

【0013】

また本発明は、試料中の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リポ蛋白成分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リポ蛋白成分のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法である。

【0014】

更に本発明は、試料中の第1の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白成分に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の第2の測定成分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する第1の測定成分中のコレステロールを測定し、更にこれと総コレステロール濃度から、各成分のコレステロール濃度を求める方法である。

【0015】

更にまた本発明は、上記各方法を実施するための試料中の一方のリポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、他方のリポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬を提供するものである。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明においては、リポ蛋白中に含まれるコレステロールをコレステロール測定用試薬と反応させるに先立ち、一方の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物（以下、「選択親和剤」という）および他方の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤（以下、「選択作用活性剤」という）を添加することが必要である。

【0017】

このうち、選択親和剤は、反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白成分と相互作用を有し、当該リポ蛋白成分のコレステロール測定用試薬との反応を妨害ないしは抑制する働きをするものである。また、選択作用活性剤は、反応ないしは測

定すべきリポ蛋白成分と反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白成分が同一系中に存在する場合に、反応ないしは測定すべきリポ蛋白成分に対して強く作用し、これとコレステロール測定用試薬との反応を促進する作用を有するものである。

【0018】

本発明で使用する選択親和剤および選択作用活性剤には、それぞれ一方のリポ蛋白成分に対する相対的な親和性および他方のリポ蛋白成分に対する相対的に強い作用を有するものであり、絶対的なものまでは要求されない。その理由は、一方のみの選択使用では問題となる相対的な誤差も、両者の使用により問題とならないレベルまで低減され、実用上は問題とならないからである。

【0019】

本発明において使用される選択親和剤は、反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分に対し親和性を有する化合物が挙げられる。ここでいうリポ蛋白表層を構成する成分としては、コレステロール、リン脂質、アポ蛋白質等が挙げられる。

【0020】

この選択親和剤としては、サポニン類、コレステロール誘導体、ポリエン系物質、ペプチド類、レクチン類等を挙げることができる。このうちコレステロールに親和性を有するサポニン類としては、例えばジギトニン、トマチンなどが、ポリエン系物質としては、ナイスタチン、フィリピン、ピマシリン、ペンタマイシン、トリコマイシン、フンジクロミン、ペリマイシン、アンホテリシン、エトルスコマイシン、プリマイシン、カンジジンなどが、コレステロール誘導体としては、[N-[2-Cholesterylcarboxy amino) ethyl] carbamoylmethyl] pullulan (略称 Chol-AE CM-Pullulan) などが、ペプチド類としてはバシトラシン、ポリミキシン、スズカシリン、グラミシジンなどが、レクチン類としてはコンカナバリン A、ヒマレクチン、ピーナッツレクチンなどがそれぞれ挙げられる。

【0021】

これらの選択親和剤は、単独で、あるいは2種以上を組み合わせて用いる事ができ、またその使用量は、化合物によって異なり、特に制限されるものではない

が、 $1\text{ nM} \sim 0.1\text{ M}$ または $1 \times 10^{-7}\% \sim 10\%$ の範囲程度であり、好ましくは $10\text{ nM} \sim 0.1\text{ M}$ または $1 \times 10^{-6}\% \sim 1\%$ で使用される。またこれら化合物を溶解する目的で、アルコールなどの有機溶媒類、界面活性剤類、リン脂質類を用いてもよい。これらの溶解剤類は単独で、或いは2種以上を組み合わせる用いる事ができ、またその使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではない。

【0022】

一方、選択作用活性剤としては、反応ないしは測定すべきリポ蛋白と反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白に対する作用強度が相違するものであればイオン性、非イオン性のいずれでも良く、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等が挙げられる。特に好ましい選択作用活性剤としては、特定のリポ蛋白に対し特に強い反応性を有する界面活性剤（特開平9-313200号）などが挙げられる。これらの選択作用活性剤の市販品の例としては、トリトンX-100、エマルゲン709、エマルゲンA-60、ヘプタンスルホン酸、オクタンスルホン酸などを挙げる事ができる。

【0023】

本発明の選択作用活性剤は、単独で、或いは2種以上を組み合わせる用いる事ができる。またその使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではないが、 $0.0001\% \sim 5\%$ で、好ましくは $0.001\% \sim 5\%$ で使用される。

【0024】

本発明を実施するにあたり、選択親和剤と選択作用活性剤とを、検体である血清へ添加するに際しては、それぞれを別途添加しても、またこれらを混合物として同時に添加してもよい。更にコレステロールの測定方法としては、公知の酵素的測定法のいずれも用いる事ができるが、例えば酵素試薬としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせる用いる方法、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせる用いる方法等が挙げられる。これらのうち、コレステロールエステラーゼ及びコレ

ステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法が好ましい。

【0025】

更にまた、これらのコレステロール測定用酵素試薬を添加した後、最終的にコレステロールを検出する方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体をさらに組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法等が挙げられる。

【0026】

本発明方法の具体的態様は、次の方法で示される。

(1) 試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白画分中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

(2) 試料中の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リポ蛋白画分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リポ蛋白画分のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

(3) 試料中の第1の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白成分に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の第2の測定画分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する第1の測定画分中のコレステロールを測定し、更にこれと総コレステロール濃度から、各画分のコレステロール濃度を求める方法。

【0027】

また、上記方法の実施に当たっては、選択親和剤、選択作用活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬を使用することが便利である。このコレステロール定量試薬は、上記各方法に対応して、次の如く構成される。

【0028】

方法（１）を実施するための試薬：

試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロール定量用試薬。

方法（２）を実施するための試薬：

試料中の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬。

方法（３）を実施するための試薬：

試料中の第１の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第１のリポ蛋白成分に比べ試料中の第２の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬

【 0 0 2 9 】

上記のコレステロールの定量用試薬中には、一般的に汎用される緩衝液、例えばりん酸、グッドの緩衝液などを含有させることができる。この定量用試薬を溶解させた場合のpHの範囲も酵素試薬に影響しない範囲であれば特に限定されるものではない。また塩化ナトリウムなどの無機の塩、酵素活性安定化のため使用されるアルブミンなどの添加剤、２価金属の塩や防腐効果のある化合物なども使用することができる。

【 0 0 3 0 】

【発明の効果】

以上説明した本発明方法によれば、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率良く特定画分中のコレステロールを定量する事ができる。また、少ない試料で、簡便な操作により、特異的な測定が可能であるため、種々の自動分析装置に適用でき、臨床検査の領域に置いても極めて有用である。

【 0 0 3 1 】

【実施例】

次に、実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに何ら制約

されるものではない。

【0032】

実施例 1

リポタンパク質を含む検体について、下記方法で検体を調製後、同じく下にする方法でリポ蛋白画分毎のコレステロール量を測定し、反応性を比較した。この結果を表1に示す。

【0033】

(検 体 の 調 製)

ヒト血清から超遠心分離法により、VLDL、LDL、HDLの各画分に分離し試料とした。

【0034】

(測 定 法)

検体 $3 \mu\text{l}$ に、 0.005% ジギトニンを含む 50 mM のりん酸緩衝液 ($\text{pH } 6.5$) (第1試薬) $300 \mu\text{l}$ を添加した。次いで約5分後に、トリトンX-100 0.2% 、コレステロールエステラーゼ $1 \text{ U}/\text{ml}$ 、コレステロールオキシダーゼ $1 \text{ U}/\text{ml}$ 、パーオキシダーゼ $5 \text{ U}/\text{ml}$ 及びジスルホプロピルメタトルイジン 0.04% 、4-アミノアンチピリン 0.004% を含む 50 mM のりん酸緩衝液 ($\text{pH } 6.5$) からなるコレステロール測定試薬 (第2試薬) $100 \mu\text{l}$ を加えた。

【0035】

コレステロール測定試薬添加直前と添加後5分後の 600 nm と 700 nm における吸光度を測定し、その差よりリポ蛋白画分間の反応性を比較した (2ポイント法)。また、校正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

【0036】

(結 果)

BEST AVAILABLE COPY

【表 1】

試 料	選択親和剤 の添加なし	0.005% ジギトニン添加
HDL 画分	0.104 (100%)	0.099 (95%)
LDL 画分	0.315 (100%)	0.218 (69%)
VLDL 画分	0.267 (100%)	0.136 (51%)

【0037】

表 1 の結果より、ジギトリンを系内に存在させることにより LDL-C や VLDL-C に比べ HDL のコレステロールが優先的に酵素反応することが分かる。

【0038】

実施例 2

実施例 1 の第 1 試薬のジギトニンを 0.005% Chol-AECM-Pullulan、第 2 試薬の界面活性剤トリトン X-100 を 1% エマルゲン B-66 に代える以外は実施例 1 に従って測定し、測定値を比較した。この結果を表 2 に示す。

【0039】

(結 果)

【表 2】

試 料	選択親和剤 の添加なし	0.005% Chol- AECM-Pullulan 添加
HDL 画分	0.133 (100%)	0.132 (99%)
LDL 画分	0.028 (100%)	0.019 (67%)
VLDL 画分	0.025 (100%)	0.013 (50%)

【0040】

表2の結果よりChol-AECM-Pullulanを系内に存在させることにより、LDL-CやVLDL-Cに比べHDL中のコレステロールが優先的に酵素反応することが分かる。

【0041】

実施例 3

リポタンパク質を含む25例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈澱法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。

【0042】

すなわち、検体3 μ lに、ジギトニン 0.005% (40 μ M) を含む50mMのグッド緩衝液 (pH6.5) (第1試薬) 300 μ lを添加した。次いで約5分後に、エマルゲンB-66 1%、コレステロールエステラーゼ1U/ml、コレステロールオキシダーゼ1U/ml、パーオキシダーゼ5U/ml及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.004%を含む50mMのりん酸緩衝液 (pH6.5) からなるコレステロール測定試薬 (第2試薬) 100 μ lを加えた。

【0043】

コレステロール測定試薬添加直前と添加5分後での、600nmと700nmにおける吸光度を測定し、その差より血清検体中のHDLコレステロール濃度を求めた (2ポイント法)。また、校正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

【0044】

一方、沈澱法 (比較法) でのHDL中のコレステロールの測定は、次のようにして行った。すなわち、リンタンゲステン酸ナトリウム 0.3%及び塩化マグネシウム2%を含む水溶液200 μ lを検体200 μ lと混和し、3000rpmで10分間遠心分離を行った。この上清50 μ lを採取し、TritonX-100 1%、コレステロールエステラーゼ1U/ml、コレステロールオキシダーゼ1U/ml、パーオキシダーゼ5U/ml及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.004%を含む100mMのMES緩

衝液 (pH 6.5) からなるコレステロール測定試薬 3 ml と混合し、37℃で 10 分間インキュベートした後、600 nm における吸光度を測定し、HDL 中のコレステロール濃度を求めた。これらの結果を表 3 および図 1 に示す。

【0045】

【表 3】

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
1	99.6	103.6
2	91.8	95.2
3	81.6	86.6
4	78.6	80.1
5	71.9	74.4
6	70.3	71.9
7	67.6	72.4
8	70.1	72.1
9	66.6	70.1
10	64.5	67.4
11	64.5	67.4
12	60.9	63.2
13	60.3	62.6
14	54.6	55.0
15	55.0	56.9
16	50.7	51.0
17	50.9	52.7
18	49.2	51.2
19	47.0	48.7
20	45.7	47.4
21	41.0	41.8
22	37.9	40.2
23	39.6	40.3
24	94.8	98.4
25	88.5	93.3
相関係数		0.999
傾き		1.052
切片		-0.921

【0046】

表 3 および図 1 に示したとおり、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈澱法と極めて良好な相関を有するものであることが示された。

【0047】

実施例 4

実施例 3 において、第 1 試薬にて加えたジギトニンを 0.1% ポリミキシンお

よび0.005%コンカナバリンAに代える以外は実施例3と同一にし、リポタンパク質を含む25例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈澱法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。この結果を表4および図2に示す。

【0048】

【表4】

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
1	113.8	112.4
2	100.3	104.0
3	96.9	98.9
4	91.6	97.3
5	86.5	89.1
6	83.9	87.2
7	83.7	87.4
8	79.0	82.0
9	78.2	79.6
10	74.7	78.3
11	72.5	74.0
12	72.3	71.9
13	70.4	73.2
14	66.5	68.4
15	65.9	68.7
16	62.7	64.8
17	58.0	59.7
18	52.5	54.4
19	49.7	52.1
20	45.6	47.8
21	42.3	45.9
22	39.0	40.7
23	39.8	40.8
24	38.2	38.4
25	34.2	36.7
相関係数		0.998
傾き		1.007
切片		1.775

【0049】

表4および図2の結果より、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈澱法と良好な相関を有するものであることが示された。

【0050】

実施例 5

実施例 3 において、第 1 試薬にて加えたジギトニンを $5 \times 10^{-4} \%$ (800 nM) フィリピンに代える以外は実施例 3 と同一にし、リポタンパク質を含む 25 例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈澱法により、HDL 中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。この結果を表 5 および図 3 に示す。

【0051】

【表 5】

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
1	113.8	120.7
2	100.3	111.7
3	96.9	105.6
4	91.6	102.0
5	86.5	90.2
6	83.9	93.0
7	83.7	90.5
8	79.0	80.0
9	78.2	80.7
10	74.7	80.9
11	72.5	80.1
12	72.3	72.9
13	70.4	73.1
14	66.5	67.9
15	65.9	67.0
16	62.7	65.3
17	58.0	59.4
18	52.5	58.0
19	49.7	55.8
20	45.6	48.0
21	42.3	45.6
22	39.0	41.2
23	39.8	41.7
24	38.2	40.7
25	34.2	41.1
相関係数		0.993
傾き		1.075
切片		-0.473

【0052】

表 5 および図 3 の結果より、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈澱法と良好な相関を有するものであることが示された。

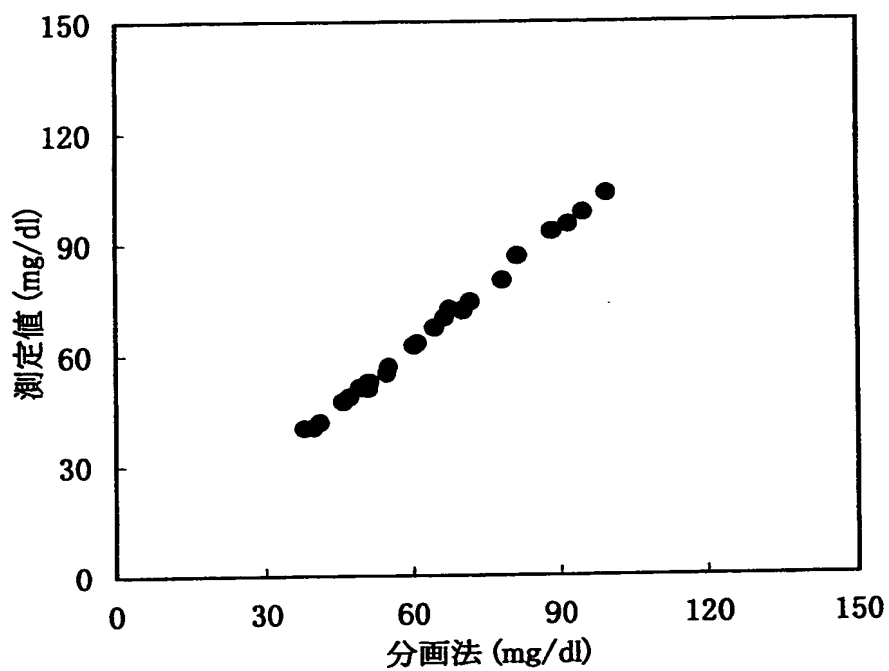
【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 実施例 3 の方法と従来の沈澱法との相関関係を示す図面。
- 【図 2】 実施例 4 の方法と従来の沈澱法との相関関係を示す図面。
- 【図 3】 実施例 5 の方法と従来の沈澱法との相関関係を示す図面。

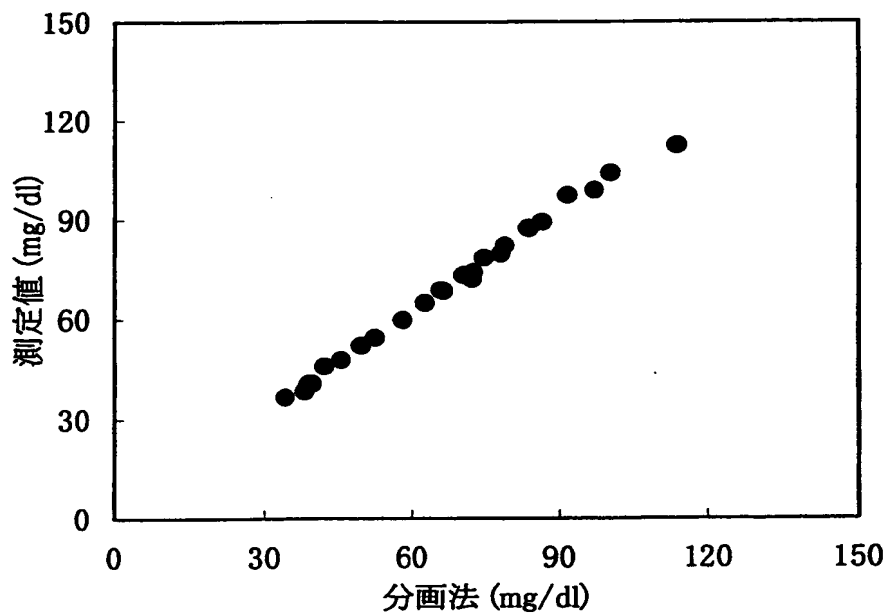
以 上

【書類名】 図面

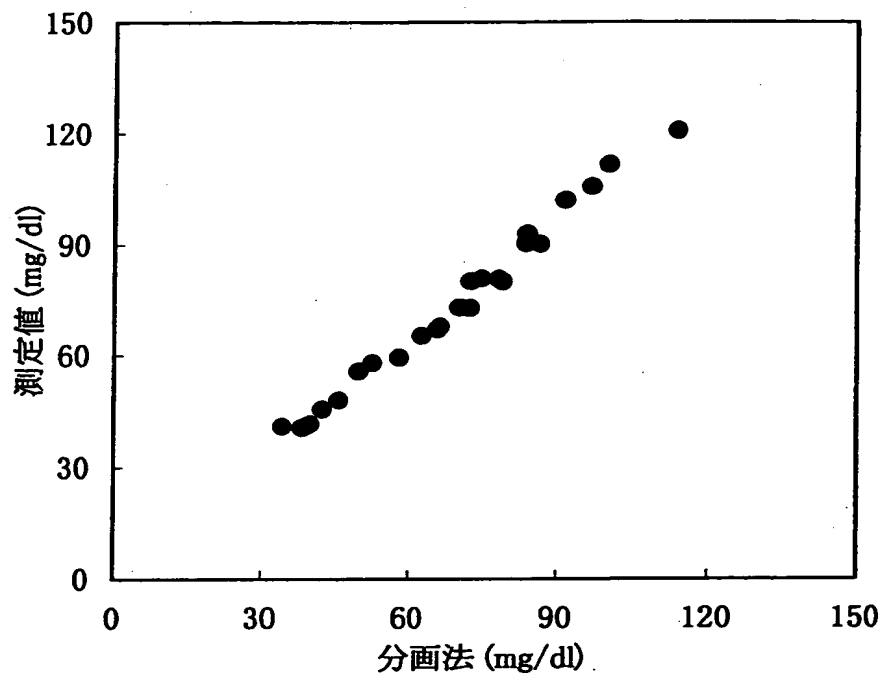
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率よく測定する事ができ、種種の自動分析装置に適用できる特定画分中のコレステロールの定量法を提供すること。

【解決手段】 試料中の非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白画分中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法および試料中の測定リポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リポ蛋白画分に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リポ蛋白画分のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法並びにこれら方法を実施するための試料中の一方のリポ蛋白成分に対し相対的に強い親和性を有する化合物、他方のリポ蛋白成分に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390037327]

1. 変更年月日	1990年12月12日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋3丁目13番5号
氏 名	第一化学薬品株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)